

SOS, 154

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
4. September 2003 (04.09.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/073464 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **H01J 49/42**
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/01274
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
10. Februar 2003 (10.02.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
102 08 626.5 28. Februar 2002 (28.02.2002) DE  
102 08 625.7 28. Februar 2002 (28.02.2002) DE
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): METANOMICS GMBH & CO. KGAA [DE/DE]; Tegeler Weg 33, 10589 Berlin-Charlottenburg (DE).

## Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): WALK, Tilmann, B. [DE/DE]; Bismarckstrasse 40, 10627 Berlin (DE). DOSTLER, Martin [DE/DE]; Auf der Lichtung 69, 16761 Henningsdorf (DE).

(74) Anwalt: BIEBERBACH, Andreas; c/o BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(54) Title: MASS SPECTROMETRY METHOD FOR ANALYSING MIXTURES OF SUBSTANCES

(54) Bezeichnung: MASSENSPEKTROMETRISCHES VERFAHREN ZUR ANALYSE VON SUBSTANZGEMISCHEN

**A1**  
(57) Abstract: The invention relates to a mass spectrometry method for analysing mixtures of substances using a triple quadrupole mass spectrometer, whereby said mixtures of substances are ionised prior to analysis. The invention is characterised in that the method comprises the following steps: a) selection of a mass/charge quotient ( $m/z$ ) of an ion created by ionisation in a first analytical quadrupole (I) of the mass spectrometer; b) fragmentation of the ion selected in step (a) by applying an acceleration voltage in an additional subsequent quadrupole (II), which is filled with a collision gas and acts as a collision chamber; c) selection of a mass/charge quotient of an ion created by the fragmentation process in step (b) in an additional subsequent quadrupole (III), whereby steps (a) to (c) of the method are carried out at least once; and d) analysis of the mass/charge quotients of all the ions present in the mixture of substances as a result of the ionisation process, whereby the quadrupole (II) is filled with collision gas, but no acceleration voltage is applied during the analysis. Steps (a) to (c) and step (d) can also be carried out in reverse order.

**WO 03/073464**  
(57) Zusammenfassung: Massenspektrometrisches Verfahren zur Analyse von Substanzgemischen mit einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer, wobei die Substanzgemische vor der Analyse ionisiert wurden, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren folgende Schritte umfasst: a) Auswählen eines Masse/Ladungs-Quotienten ( $m/z$ ) eines durch Ionisation entstandenen Ions in einem ersten analytischen Quadrupol (I) des Massenspektrometers, b) Fragmentieren des unter (a) ausgewählten Ions unter Anlegung einer Beschleunigungsspannung in einem weiteren folgenden Quadrupol (II), das mit einem Kollisionsgas gefüllt ist und als Kollisionskammer fungiert, c) Auswählen eines Masse/Ladungs-Quotienten eines durch die Fragmentierung (b) entstandenen Ions in einem weiteren nachfolgenden Quadrupol (III), wobei die Verfahrensschritte (a) bis (c) mindestens einmal durchlaufen werden und d) Analysieren der Masse/Ladungs-Quotienten aller im Substanzgemisch durch die Ionisation vorhandenen Ionen, wobei das Quadrupol (II) mit Kollisionsgas gefüllt ist, jedoch während der Analyse keine Beschleunigungsspannung angelegt ist; wobei die Schritte (a) bis (c) und der Schritt (d) auch in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt werden können.

Massenspektrometrisches Verfahren zur Analyse von Substanzgemischen

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein massenspektrometrisches Verfahren zur Analyse von Substanzgemischen mit einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer.

10 Bei der Analyse komplexer Substanzgemische biologischen und/oder chemischen Ursprungs stellt sich dem Analytiker neben der Aufgabe der Identifizierung der Struktur einzelner im Gemisch enthaltenen Substanzen immer wieder das Problem alle im Gemisch vorhandenen Substanzen zu erfassen und möglichst zu quantifizieren. Dies sollte möglichst rasch und mit einer hohen Genauigkeit, das heißt mit einer geringen Fehlerabweichung erfolgen. Dies wird um so wichtiger, wenn Informationen über ein biologisches System beispielsweise über ein unter bestimmten Fermentationsbedingungen 15 angezogenen Mikroorganismus oder über eine unter verschiedenen Umweltbedingungen angewachsene Pflanze oder über einen Wildtyp-Organismus wie einem Mikroorganismus oder einer Pflanze im Vergleich zu deren genetisch veränderten Mutante gewonnen werden sollen. Derartige Vergleiche sind erforderlich, um eine Zuordnung 20 von Mutationen unbekannter Gene im Genom dieser Organismen zu einem bestimmten metabolischen Phänotyp zu ermöglichen.

Der Erfolg bei der Analyse dieser Substanzgemische beispielsweise 25 chemischer Syntheseansätze aus der kombinatorischen Chemie oder aus Extrakten von Mikroorganismen, Pflanzen oder Pflanzenteile hängt dabei im großen Ausmaß vom der Schnelligkeit und Reproduzierbarkeit der verwendeten Analytik ab. In einem solchen Screening müssen eine Vielzahl von Proben durchgemustert werden, es sind daher schnelle, einfache, hochempfindliche und hochspezifische 30 Analysenverfahren erforderlich.

Ein Hauptproblem dieser Analytik ist die rasche, einfache, reproduzierbare und quantifizierbare Identifizierung der in den Gemischen enthaltenen Substanzen. In der Regel werden zur Analyse der 35 Produkte Trennverfahren wie die Dünnschichtchromatographie (= DC), die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (= HPLC) oder die Gaschromatographie (= GC) verwendet. Mit Hilfe dieser chromatographischen Verfahren kann allerdings nicht rasch und einfach eine breite Palette von Substanzen identifiziert und quantifiziert werden. Auch Verfahren wie NMR oder Massenspektrometrie 40 werden für diese Aufgabe beschrieben. In der Regel ist jedoch eine gewisse Vorbereitung der Proben für diese Analyseverfahren

erforderlich, wie Aufarbeitung über zum Beispiel Salzfällung und/ oder anschließender Chromatographie, Aufkonzentrierung, Entsalzung der Proben, Pufferaustausch oder Entfernung eventuell in der Probe enthaltener Detergentien. Nach dieser Vorbehandlung sind 5 die Proben für die vorgenannten Analytiken verwendbar und es können einzelne Substanzen in ausgesuchten Proben identifiziert und quantifiziert werden. Diese Verfahren sind jedoch zeitaufwendig und lassen nur einen beschränkten Probendurchsatz zu, so daß derartige Analysenverfahren im sogenannten High-Throughput-Screening 10 (= HTS) oder dem breiten Screening von Substanzgemischen in biologischen oder chemischen Proben keine Anwendung finden. Von Vorteil bei sehr präzisen Methoden wie der NMR- oder IR-Spektroskopie ist, daß sie Informationen sowohl über die Struktur als auch gegebenenfalls über die Quantität einer Substanz liefern.

15 Um einen höheren Probendurchsatz im HTS zu ermöglichen, werden vielfach indirekte, leicht messbare Verfahren wie Farbreaktionen im sichtbaren Bereich, Trübungsmessungen, Fluoreszenz, Leitfähigkeitsmessungen etc. verwendet. Diese sind zwar im Prinzip sehr 20 empfindlich, aber auch störanfällig. Von Nachteil hierbei ist vor allem, daß bei diesem Vorgehen viele falsch positive Proben analysiert werden und da es sich um indirekte Nachweisverfahren handelt, keine Informationen über die Struktur und/oder die Quantität einer Verbindung vorliegen. Um diese falsch Positiven beim 25 weiteren Vorgehen ausschließen zu können, werden in der Regel weitere Analysenverfahren nach einer ersten raschen Analyse wie beispielsweise NMR, IR, HPLC/MS oder GC/MS verwendet. Dies ist wiederum sehr zeitaufwendig.

30 Generell kann gesagt werden, daß die Verbesserung der Empfindlichkeit und der Aussagekraft der Detektionsverfahren zu einer Verlangsamung in der Geschwindigkeit einer Analytik führt.

Bei der Arbeit mit komplexen biologischen Gemischen wie beispielweise Extrakten aus Mikroorganismen, Pflanzen und/oder Tieren ist außerdem zu beachten, dass einzelne Verbindungen in den Gemischen nur in sehr geringen Mengen vorhanden sind bzw. nur geringe Mengen der einzelnen Probe selbst für die Analytik zur Verfügung stehen, so dass die verwendete Methode eine Hohe Sensitivität besitzen muss. Weiterhin stellen für einige Analysenmethoden die häufig in biologischen Proben vorhandenen nicht flüchtigen Puffer und/oder Salze ein Problem dar, da diese die Sensitivität der Methoden oder deren Verwendung überhaupt negativ beeinflussen. Gleiches gilt für die Anwesenheit von Detergentien in 45 diesen Proben.

Zur Analyse komplexer Probengemische sind aus dem Stand der Technik massenspektrometrische Verfahren bekannt, die beispielsweise von der Analyse von Proben der synthetischen Chemie, der Petrochemie, von Umweltproben und biologischen Material reichen. Diese Methoden werden jedoch nur für die Analyse einzelner bekannter Verbindungen in diesen Proben eingesetzt. Breite Messreihen beispielweise im Rahmen eines HTS oder in der Identifizierung und Quantifizierung einer Vielzahl von Verbindungen in diesen Proben werden nicht beschrieben.

10

Anwendung findet dabei die Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (= GC/MS) für Substanzen, die aus den Substanzgemischen extrahierbar und leicht flüchtig sind. Für die Analyse von Substanzen bzw. Analyten, die nicht einfach oder nur schwer in die Gasphase überführt werden können und bei denen dabei ein großer Überschuss an vorliegenden Lösungsmittel entfernt werden muss, wird die sogenannte Liquid-Chromatography- oder High-Pressure-Liquid-Chromatography-Mass-Spectrometry (= HPLC/MS) verwendet. Eine Übersicht über die verschiedenen LC/MS-Methoden und ihr Equipment ist der Veröffentlichung von Niessen et al. (Journal of Chromatography A, 703, 1995: 37 - 57) zu entnehmen. In den US-Schriften US 4,540,884 und US 5,397,894 werden Massenspektrometer und ihr Aufbau beschrieben und beansprucht.

Mit Hilfe der vorgenannten Methoden lassen sich Substanzen in einem Molekulargewichtsbereich von bis zu 100 KD (= KiloDalton) bestimmen, das heißt es lässt sich eine breite Palette von Substanzen beispielweise in einem unteren Massenbereich von bis etwa 5000 D (= Dalton) wie Fettsäuren, Aminosäuren, Carbonsäuren, Oligo- oder Polysaccharide, Steroide etc. und/oder in einem höheren Massenbereich über 5000 D wie Peptide, Proteine, Oligonukleotid und Oligosaccharide oder sonstigen Polymere bestimmen. Auch hochmolekulare Materialien wie Kohleteer, Huminsäure, Fulvinsäure oder Kerogene lassen sich analysieren (Zenobie and Knochenmuss, Mass Spec. Rev., 1998, 17, 337 - 366). Es lassen sich sowohl die Identität als auch die Struktur von Substanzen bestimmen, wobei die Strukturanalyse jedoch nicht immer eindeutig ist, so dass sie mit anderen Methoden beispielweise NMR bestätigt werden muss.

Von G. Hopfgartner und F. Vilbois (Analusis, 2001, 28, No. 10, 906 - 914) wird ein Verfahren zum Screenen mit Hilfe der LC/MS von in vitro oder in vivo entstandenen Metaboliten von strukturell bekannten Verbindungen beschrieben, die als Wirkstoffe in verschiedenen Phasen der Wirkstoffentwicklung sind. Dieses Verfahren läuft in zwei Schritten ab. Im ersten Suchschritt werden in einem raschen "Full Scan-Modus" interessante Ionen erfasst, die als Kandidaten für die weiteren Untersuchungen in Frage kommen.

- men. Dabei kann es sich um Ionen handeln, die Ionen besonders hoher Intensität entsprechen oder als Kandidaten möglicher Abbauprodukte bzw. Metabolite der Wirkstoffe in Frage kommen. Diese Ionen werden in einem zweiten Scan zur Identifizierung der chemischen Struktur dieser Ionen bzw. Verbindungen nach einer Fragmentierung in einer Kollisionskammer des Massenspekrometers verwendet. Um eine rasche Aufklärung der Ionen- bzw. Metabolitstruktur zu ermöglichen, enthält die Kollisionskammer ständig Kollisionsgas. Von Nachteil bei der Strukturermittlung ist, dass eine be-  
kannte Masse eines Vorläuferions, eines Fragments oder eines Ionenaddukts erforderlich ist. Vorteilhaft sollte die Ausgangsstruktur der zu untersuchenden Substanz für die HPLC/MS in diesen Experimenten bekannt sein. Da die HPLC/MS allein nicht für die absolute Strukturbestimmung geeignet ist. Ist jedoch die Struktur der Ausgangsverbindung bekannt, lassen sich Aussagen über die Struktur eventueller Metabolite machen. Da die Struktur des Substanz, die als Wirkstoff entwickelt werden soll, bekannt ist, lassen sich Aussagen über die Struktur der unbekannten Metabolite des Wirkstoffs mit einiger Sicherheit machen. Allerdings wird die Aussage durch mögliche Überlagerungen anderer als Verunreinigungen vorhandener Verbindungen gleicher Masse erschwert bzw. verhindert. Eine Quantifizierung der Verbindungen ist mit dieser Methode nicht möglich.  
  
Eine Identifizierung und Quantifizierung einer Vielzahl oder aller Einzelkomponenten in einem Substanzgemisch ohne zur Verfügung stehende Reinsubstanzen stellt auch heute noch ein ungelöstes Problem in der Massenspektrometrie dar.  
  
Es bestand daher die Aufgabe ein Verfahren zur Analyse einer Vielzahl von Verbindungen und bevorzugt deren Quantifizierung zu entwickeln.
- Diese Aufgabe wurde gelöst durch ein massenspektrometrisches Verfahren zur Analyse von Substanzgemischen mit einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer, wobei die Substanzgemische vor der Analyse ionisiert werden, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren folgende Schritte umfasst:
- a) Auswählen eines Masse/Ladungs-Quotienten ( $m/z$ ) eines durch Ionisation entstandenen Ions in einem ersten analytischen Quadrupol (I) des Massenspekrometers,

## 5

- b) Fragmentieren des unter (a) ausgewählten Ions unter Anlegung einer Beschleunigungsspannung in einem weiteren folgenden Quadrupol (II), das mit einem Kollisionsgas gefüllt ist und als Kollisionskammer fungiert,
- 5 c) Auswählen eines Masse/Ladungs-Quotient eines durch die Fragmentierung (b) entstandenen Ions in einem weiteren nachfolgenden Quadrupol (III), wobei die Verfahrensschritte (a) bis (c) mindestens einmal durchlaufen werden und
- 10 d) Analysieren der Masse/Ladungs-Quotienten aller im Substanzgemisch durch die Ionisation vorhandenen Ionen, wobei das Quadrupol (II) mit Kollisionsgas gefüllt ist, jedoch während der Analyse keine Beschleunigungsspannung angelegt ist;
- 15 wobei die Schritt (a) bis (c) und der Schritt (d) auch in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt werden können.

Unter Substanzgemische im Sinne der Erfindung sind prinzipiell alle Gemische, die mehr als eine Substanz enthalten zu verstehen, wie beispielsweise komplexe Reaktionsmischungen chemischer Synthesen wie Syntheseprodukte aus der kombinatorischen Chemie oder Substanzgemische biologischen Ursprungs wie Fermentationsbrühen einer aeroben oder anaeroben Fermentation, Körperflüssigkeiten wie Blut, Lymphe, Urin oder Stuhl, Reaktionsprodukte einer biotechnologischen Synthese mit einem oder mehreren freien oder gebundenen Enzymen, Extrakte tierischen Materials wie Extrakte aus verschiedenen Organen oder Geweben oder pflanzliche Extrakte wie Extrakte der gesamten Pflanze oder einzelner Organe wie Wurzel, Stiel, Blatt, Blüte oder Samen oder deren Mischungen. Vorteilhaft werden in diesem Verfahren Substanzgemische biologischen Ursprungs wie Extrakte tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, vorteilhaft pflanzlichen Ursprungs analysiert.

35 Die im Verfahren verwendbaren Massenspektrometer setzen sich in der Regel aus einem Probeneinlass-System, einem Ionisationsraum, einem Interface, einer Ionenoptik, einem oder mehreren Massenfiltern und einem Detektor zusammen.

40 Zur Erzeugung von Ionen im Verfahren können prinzipiell alle dem Fachmann bekannten Ionenquellen verwendet werden. Diese Ionenquellen werden je nach verwendeter Ionenquelle über ein sogenanntes Interface an die folgenden Komponenten des Massenspektrometers beispielsweise der Ionenoptik, dem oder den Massenfiltern oder dem Detektor gekoppelt. Die Zwischenschaltung eines Interfaces hat den Vorteil, dass die Analyse ohne Verzögerung durchgeführt werden kann. Weiterhin können durch die Ionenquelle nicht-

45

## 6

flüchtige und/oder flüchtige bevorzugt nichtflüchtige Substanzen direkt in die Gasphase gebracht werden. Es können dadurch auch Vorreinigungen von Substanzgemischen über eine vorteilhafte chromatographische Auftrennung durchgeführt werden, die unterschiedlich breite Stoffflüsse in der Analytik aufweisen, da über das Interface diese Stoffflüsse verarbeitet werden können. Die zu analysierenden Proben bzw. die darin enthaltenen Substanzen können dadurch außerdem angereichert werden. Weiterhin kann eine breite Palette von Lösungsmitteln bei geringstem Verlust an Probe verarbeitet werden.

Bei der Ionisation werden im wesentlichen drei Prozesse zur Erzeugung der geladenen Teilchen (Ionen) verwendet:

- 15 a) Verdampfung der Substanzgemische und Ionisation der Moleküle bzw. des Substanzgemisches in der Gasphase, beispielsweise wie bei der Elektronenstoss-Ionisation (EI), bei der die Moleküle mit einem Elektronenstrahl in einer Ionisationskammer bei niedrigem Druck ( $<10^{-2}$  Pa) verdampft werden oder wie 20 bei der chemischen Ionisation (CI) mit einem Reaktandgas bei die Ionen bei einem erhöhten Druck ca. 100 Pa erzeugt werden. Typische Reaktandgase sind beispielsweise Methan, Isobutan, Ammonium, Argon oder Wasserstoff. Wird die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck durchgeführt, so spricht man von 25 der sogenannten "Atmospheric-Pressure Chemical Ionization (APCI).
- b) Desorption der Substanzgemische von einer Oberfläche beispielsweise wie bei der Plasma Desorption (PD), der Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry (LSIMS), dem Fast Atom Bombardment (FAB), der Laser Desorption (LD) oder dem Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI). Bei all diesen Methoden werden die Substanzgemische durch einfallende energiereiche Partikel (radioaktiver Zerfall, 30 UV-, IR-Photonen, Ar<sup>+</sup>- oder Cs<sup>+</sup>-Ionen, Laserstrahlen) in einer Kollisionskaskade vibratorisch angeregt und dadurch ionisiert.
- c) Zerstäubung der Substanzgemische im elektrischen Feld, wie 40 bei der Electrospray-Ionisation (ESI). Bei der Zerstäubung der Substanzgemische im elektrischen Feld werden die Proben bei Atmosphärendruck zerstäubt. Die Electrospray-Ionisation ist eine sehr schonende Methode. Bei der ESI werden kontinuierlich Ionen gebildet. Diese kontinuierliche Ionenbildung hat den Vorteil, dass sie mühelos 45 in Verbindung mit fast jedem Analysatortyp gekoppelt werden kann und dass sie sich problemlos mit einer chromatographi-

schen Auftrennung wie einer Auftrennung über Kapillar-Elektrophorese (CE), Liquid Chromatography (LC) oder High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) verbinden lässt, da sie eine gute Toleranz für hohe Flussraten bis zu 2 ml/min Eluat hat. Dabei wird das Versprühen des Eluenten pneumatisch durch ein sogenanntes Vernebelungsgas beispielsweise Stickstoff unterstützt. Hierzu wird das Gas unter einem Druck von bis zu 4 bar, vorteilhaft bis zu 2 bar aus einer Kapillare ausgeblasen, die die Einlasskapillare des Eluenten umschließt. Auch höhere Drücke sind prinzipiell möglich. Bei der vorgeschalteten chromatographischen Auftrennung sind sogenannte Normalphasen- (z.B. Kieselgel-, Aluminiumoxid-, Aminodesoxyhexit-, Aminodesoxy-d-glucose-, Triethylentetramin-, Polyethylenoxid- oder Aminodicarboxy-Säulen) und/oder Reversed-Phase-Säulen bevorzugt Reversed-Phase-Säulen wie Säulen mit einer C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub> oder C<sub>18</sub> stationären Phase bevorzugt. Unter Standardbedingungen führt die Electrospray-Technik aufgrund der äußerst schonenden Ionisierung zum (Quasi-)Molekülion. Meist sind dies Addukte mit bereits in der Probenlösung vorhandenen Ionen (z.B. Protonen, Alkali- und/oder Ammoniumionen). Weiterhin von Vorteil ist, dass sich auch mehrfach geladene Ionen detektieren lassen, so dass Ionen mit einem Molekulargewicht von bis zu hunderttausend Dalton detektieren lassen, vorteilhaft lassen sich im erfindungsgemäßen Verfahren Molekulargewichte in einem Bereich von 1 bis 10000 Dalton, bevorzugt in einem Bereich von 50 bis 8000 Dalton, besonders bevorzugt in einem Bereich von 100 bis 4000 Dalton detektieren. Als weitere beispielhafte Methoden sei die Ionenspray-Ionisation, die Atmospheric Pressure Ionisation (APCI) oder die Thermospray-Ionisation genannt.

Bei den vorgenannten Ionisierungsmethoden läuft der Ionisierungsprozeß unter Atmosphärendruck ab und gliedert sich im wesentlichen in drei Phasen: Zunächst wird die zu analysierende Lösung in einem starken elektrostatischen Feld, das durch Erzeugen einer Potentialdifferenz von 2-10 kV, vorteilhaft von 2-6 kV, zwischen der Einlasskapillare und einer Gegenelektrode erzeugt wird, versprüht. Ein elektrisches Feld zwischen der Einlasskapillarspitze und dem Massenspektrometer durchdringt dabei die Analytlösung und trennt dabei die Ionen in einem elektrischen Feld auf. Positive Ionen werden dabei im sogenannten positive Mode an die Oberfläche der Flüssigkeit gezogen, negative Ionen in die Gegenrichtung oder umgekehrt bei Messungen im sogenannten positiv Mode. Die an der Oberfläche akkumulierten positiven Ionen werden im folgenden weiter in Richtung der Kathode gezogen. Bei der Verwendung von Sprühkappilaren (NanoSpray), in denen die zu unter-

suchende Lösung nicht durch das Anlegen von Druck aus der Kapillare gepresst wird, bildet sich ein Flüssigkeitskonus, der sog. Taylor-Konus aus, da die Oberflächenspannung der Flüssigkeit dem elektrischen Feld entgegen wirkt. Ist das elektrische Feld stark genug, ist der Konus stabil und emittiert an seiner Spritze kontinuierlich einen Flüssigkeitsstrom. Beim druckunterstützten Versprühen der zu untersuchenden Lösung (z.B. mit HPLC) ist der Taylor-Konus nicht so ausgeprägt.

Dabei bildet sich jeweils ein Aerosol aus, das aus Analyt und Lösungsmittel besteht. Im folgenden Stadium findet die Desolvatisierung der gebildeten Tropfen statt, was zur sukzessiven Verringerung der Tropfengröße führt. Die Verdampfung des Lösungsmittels wird durch thermische Einwirkung, z.B. durch Zuführung heißen Inertgases, erreicht. Durch die Verdampfung in Zusammenwirken mit den elektrostatischen Kräften steigt die Ladungsdichte an der Oberfläche der eingesprühten Substanzgemischtröpfchen ständig. Überschreitet dabei schließlich die Ladungsdichte bzw. deren Ladungsrepulsionskräfte die Oberflächenspannung der Tröpfchen (sogenannte Raleigh-Grenze), so explodieren (Coulomb-Explosion) diese Tröpfchen in kleinere Teiltröpfchen. Dieser Prozess "Lösungsmittel-Verdampfung/Coulomb-Explosion" wird mehrfach durchlaufen bis schließlich die Ionen in die Gasphase überreten. Um gute Messergebnisse zu erhalten, müssen der Gasfluss im Interface, die angelegte Heiztemperatur, die Flussrate des Heizgases, der Druck des Vernebelungsgases und die Kapillarspannung genau überwacht und gesteuert werden.

Mit den verschiedenen Ionisationsverfahren können einfach oder mehrfach geladene Ionen erzeugt werden. Für das erfindungsgemäße Verfahren werden als Ionisationsverfahren Verfahren zur Zerstäubung des Substanzgemisches im elektrischen Feld wie das Thermo-spray-, das Electrospray- (= ES) oder das Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (= APCI)-Verfahren vorteilhaft verwendet. Bei der APCI-Ionisation erfolgt die Ionisierung in einer sogenannten Corona-Entladung. Bevorzugt wird das Thermospray- oder Electrospray-Verfahren, besonders bevorzugt ist das Electrospray-Verfahren. Der Ionisationsraum steht über ein Interface, das heißt über einer Mikroöffnung (100 µm) mit dem folgenden Massenspektrometer in Verbindung. Auf der Seite der Ionisierungskammer ist noch eine Interface-Platte mit einer größeren Öffnung angebracht. Zwischen dieser Platte und dem sogenannten "orifice" wird ein aufgeheiztes Trägergas (= Curtain-Gas) beispielsweise Stickstoff eingeblasen. Der Stickstoff kollidiert dabei mit den beispielsweise durch Electrospray erzeugten Ionen, die im Substanzgemisch erzeugt wur-

den. Durch Einblasen des Curtain-Gas wird vorteilhaft verhindert, dass Neutralteilchen in das Hochvakuum des nachfolgenden Massenspektrometer gesaugt werden. Weiterhin wird durch das Curtain-Gas die Desolvatisierung der Ionen unterstützt.

5

Das erfindungsgemäße Verfahren kann mit allen dem Fachmann bekannten Quadrupolmassenspektrometern wie den Tripel-Quadrupol-Massenspektrometern durchgeführt werden. In US 2,939,952 beschreibt und beansprucht Paul et al. ein erstes derartiges Gerät.

10 Diese Geräte haben einen vorteilhaften Massenbereich bis etwa m/z = 4000 und erzielen Auflösungswerte zwischen 500 und etwa 5000. Sie verfügen über eine hohe Ionentransmission von der Quelle bis zum Detektor, sind leicht zu fokussieren und zu kalibrieren und verfügen vorteilhaft über eine große Stabilität der Kalibrierung  
15 im Dauerbetrieb. Tripel-Quadrupol-Instrumente bilden die Standard-Instrumente für Niedrigenergie-Kollisionsaktivierungsstudien. Üblicherweise bestehen diese Geräte aus einem ersten Quadrupol, das zur Analyse des Masse/Ladungs-Quotienten (m/z) der in dem Substanzgemisch nach Ionisation enthaltenen Ionen im Hoch-  
20 vakuum (ca.  $10^{-5}$  Torr) geeignet ist, wobei die Masse(n) einzelner Ionen, mehrerer oder aller Ionen gemessen werden können. Diesem ersten analytischen Quadrupol (= I oder Q1) können ein oder mehrere Quadrapole (= Q0) vorgeschaltet sein, die in der Regel zur Fokussierung der Ionen verwendet werden. Anstelle dieses oder  
25 dieser vorgeschalteten Quadrapole können auch sogenannte "Cones" Linsen oder Linsensysteme zur Fokussierung und Einbringung der Ionen in das erste analytische Quadrupol verwendet werden. Auch Kombinationen aus Quadrupolen und Cones sind realisiert und verwendbar.

30

Ein weiteres Q1 folgendes Quadrupol (= II oder Q2) dient als Kollisionskammer. In ihm werden die Ionen vorteilhaft unter Anlegung einer Fragmentierungsspannung fragmentiert. Zur Fragmentierung werden Ionisierungspotenziale im Bereich von 5-11 Elektronenvolt (eV), bevorzugt von 8-11 Elektronenvolt (eV) angelegt. Q2 ist außerdem für die Fragmentierung im erfindungsgemäßen Verfahren mit einem Kollisionsgas wie einem Edelgas wie Argon oder Helium oder einem anderen Gas wie CO<sub>2</sub> oder Stickstoff oder Mischungen dieser Gase wie Argon/Helium oder Argon/Stickstoff  
35 gefüllt. Aus kostengründen ist Argon und/oder Stickstoff bevorzugt. In der Kollisionskammer liegt das Kollisionsgas im erfindungsgemäßen Verfahren mit einem Druck von  $1 \times 10^{-5}$  bis  $1 \times 10^{-1}$  Torr, bevorzugt  $10^{-2}$  vor. Besonders bevorzugt ist Stickstoff. Auch ohne die Anlegung einer Fragmentierungsspannung kann es zu einer  
40 vereinzelten Fragmentierung der Ionen in der Kollisionskammer bei Anwesenheit eines Kollisionsgases kommen. Zwischen dem Qua-  
45

10

drupol Q1 und Q2 können weitere Quadrupole oder Cones zur Lenkung der Ionen vorhanden sein.

An das Quadrupol Q2, das als Kollisionskammer dient, schließt sich schließlich ein weiteres Quadrupol (= III oder Q3) an. In diesem Q3 können entweder die m/z-Quotienten einzelner ausgewählter Fragmente, mehrerer oder aber aller in den Substanzgemischen nach Ionisation vorhandenen m/z-Quotienten (in dieser Anmeldung der einfacheitthalber als Masse oder Massen bezeichnet) bestimmt werden. Auch zwischen dem Quadrupol Q2 und Q3 können weitere Quadrupole oder Cones zur Lenkung der Ionen vorhanden sein.

Im erfindungsgemäßen Verfahren können einzelne Quadrupole zur Sammlung von Ionen auch als Ionenfallen betrieben werden, aus denen dann die Ionen nach einiger Zeit wieder zur Analyse freigegeben werden.

Die in den Tripel-Quadrupol-Massenspektrometern verwendeten Quadrupole erzeugen ein dreidimensionales elektrisches Feld in dem die erzeugten Ionen gehalten bzw. gelenkt werden können. Sie bestehen in der Regel aus 4, 6 oder 8 Stäben oder Stangen mit deren Hilfe wird ein oszillierendes elektrisches Feld erzeugt wird, wobei gegenüberliegende Stäbe elektrisch verbunden sind. Neben der Bezeichnung Quadrupol werden auch die Bezeichnungen Hexa- oder Octapol verwendet. In der vorliegenden Anmeldung sollen diese Bezeichnungen mit umfasst sein, wenn der Begriff Quadrupol verwendet wird. Vorteilhaft sind in den Quadrupolen des Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer zur Lenkung der Ionen nur geringe Beschleunigungsspannungen von wenigen Volt bevorzugt von einigen 10 V erforderlich.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden vorteilhaft Substanzmische wie tierische oder pflanzliche Extrakte, bevorzugt pflanzliche Extrakte verwendet.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden nach der Ionisierung der Substanzgemische die weiteren Verfahrensschritte durchlaufen

- I) In den Verfahrensschritten (a) bis (c) wird die Masse mindestens eines im Substanzgemisch nach Ionisation in Q1 vorhandenen Ions analysiert und ausgewählt. Dieses ausgewählte Ion wird anschließend in Q2 in Gegenwart von Kollisionsgas und einer Fragmentierungsspannung fragmentiert und danach wird eines der entstandenen Fragment-Ionen in einem weiteren analytischen Quadrupol Q3 identifiziert und vorteilhaft auch quantifiziert. Dabei erfolgt die Auswahl des zu analysierenden Fragment-Ions in der Weise, dass diese Ion vorteilhaft

## 11

eine hohe Intensität, eine leicht identifizierbare charakteristische Masse hat und in einer vorteilhaften Ausführungsform des Verfahrens eine leichte Quantifizierung ermöglicht.

- 5 II) Anschließend werden im Verfahrensschritt (d) die Massen aller im Substanzgemisch nach Ionisation vorhandenen Ionen analysiert, wobei das als Kollisionskammer benutzte Quadrupol Q2 immer mit Kollisionsgas gefüllt ist, jedoch in Verfahrensschritt (d) keine Fragmentierungsspannung an Q2 anliegt.
- 10 Diese Analyse kann prinzipiell sowohl mit Q1 und als auch mit Q3 erfolgen, vorteilhafter ist es jedoch die Analyse mit Q3 durchzuführen, da zwischen Q1 und dem an das Massenspektrometer anschließenden Detektor als Kollisionskammer verwendete Quadrupol Q2 liegt. Sollte in Q2 eine Fragmentierung trotz
- 15 dem fehlen anliegender Fragmentierungsspannung auftreten, so hat dies keinen Einfluss auf eine mögliche Erfassung der Ionenmassen am Detektor. Im Falle einer Massenanalyse mit Q1 würde eine solche Fragmentation in Q2 jedoch zu Fehlschlüssen bei der Detektion führen. Deshalb ist eine Massendetektion mit Q3 bevorzugt, da mögliche Fehlerquellen eliminiert
- 20 werden bzw. vernachlässigbar sind.

Die oben aufgeführten Prozessschritte (I) bzw. (II) können auch in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt werden. Figur 1 ist der Ablauf des erfindungsgemäßen Verfahren zu entnehmen. Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die Verfahrensschritte (b) bis (d) und (e) vorteilhaft innerhalb von 0,1 bis 10 Sekunden mindestens einmal durchlaufen bevorzugt innerhalb von 0,2 bis 6 Sekunden mindestens einmal, besonders bevorzugt innerhalb von 0,2 bis 2 Sekunden, ganz besonders bevorzugt mindestens einmal innerhalb von 0,3 bis unter 2 Sekunden. Um eine vorteilhafte statistische Auswertung der Messungen zu ermöglichen werden die Verfahrensschritte innerhalb von 0,2 bis 6 Sekunden zwei- bis dreimal bevorzugt dreimal durchlaufen. Um derartige rasche schnell hintereinander folgende Messungen zu ermöglichen, ist das als Kollisionskammer fungierende Quadrupol Q2 ständig mit Kollisionsgas gefüllt. Wie die eigenen Messungen zeigten, hat dies keinen negativen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Messungen.

40 Während einer Analyse können im erfindungsgemäßen Verfahren zwischen 1 und 100 Masse/Ladungs-Quotienten verschiedener in Schritt (a) entstandener und ausgewählter Ionen analysiert werden. Vorteilhaft werden mindestens 20 m/z-Quotienten, bevorzugt mindestens 40 m/z-Quotienten, besonders bevorzugt mindestens 60 m/z-45 Quotienten, ganz besonders bevorzugt mindestens 80 m/z-Quotienten

## 12

unterschiedlicher Ionen oder mehr identifiziert und/oder quantifiziert.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens können vorteilhaft 5 neben der Analyse aller in einem Substanzgemisch vorhandenen Massen auch einzelne Substanzen bzw. deren Massen analysiert und vorteilhaft quantifiziert werden.

Eine Reinigung der Substanzgemische ist im erfindungsgemäßen Verfahren prinzipiell nicht erforderlich. Die Substanzgemische können direkt nach Einbringung in eine Ionenquelle gemessen werden. Dies gilt auch für komplexe Substanzgemische. Auch müssen den Substanzgemischen als interne Standards keine markierten oder unmarkierten Reinsubstanzen möglicher in den Gemischen enthaltenden 15 Substanzen zugesetzt werden obwohl dies natürlich möglich ist und eine anschließende Quantifizierung der in den Gemischen enthaltenen Substanzen vereinfacht.

Eine Aufreinigung über dem Fachmann bekannte Verfahren wie chromatographische Verfahren ist jedoch von Vorteil. Aufgrund der im erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugten Ionisationsmethode über eine Zerstäubung der Substanzgemische im elektrischen Feld lässt sich eine Auf- und/oder Vorreinigung der Substanzgemische beispielsweise über eine Chromatographie sehr einfach an die massenspektrometrische Analyse ankoppeln. Als chromatographische Verfahren können dabei alle dem Fachmann bekannte Trennmethoden wie LC-, HPLC- oder Kapillarelektrophorese- verwendet werden. Trennverfahren, die auf der Adsorptions-, Gelpermeations-, Ionenpaar-, Ionenaustausch-, Ausschluss-, Affinitäts-, Normalphasen- oder Reversed Phase-Chromatographie basieren, um nur einige mögliche zu nennen, können verwendet werden. Vorteilhaft werden Normalphasen- und/oder Reversed-Phase basierende Chromatographien, bevorzugt Reversed-Phase-Säulen mit unterschiedlichen hydrophobe modifizierten Materialien wie C<sub>4</sub>-, C<sub>8</sub>- oder C<sub>18</sub>- Phasen verwendet.

35

Im erfindungsgemäßen Verfahren ist eine Kopplung von Aufreinigungsmethoden vorteilhaft von Chromatographiemethoden mit einer Fließgeschwindigkeit des Eluenten (Analyten + Lösungsmittel) vorteilhaft zwischen 1 µl/min bis 2000 µl/min, bevorzugt zwischen 40 5 µl/min bis 600 µl/min, besonders bevorzugt zwischen 10 µl/min bis 500 µl/min beispielsweise möglich. Auch geringere oder höhere Fließgeschwindigkeiten können ohne Schwierigkeiten im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden.

45 Als Lösungsmittel für das Aufreinigungsverfahren können prinzipiell alle protischen oder aprotischen polaren oder unpolaren Lösungsmittel verwendet werden, die mit der anschließenden Analy-

## 13

- tik kompatibel sind. Ob ein Lösungsmittel mit der Massenspektrometrie kompatibel ist, kann der Fachmann durch einfache Stichversuche leicht ermitteln. Geeignete Lösungsmittel sind beispielsweise Lösungsmittel, die keine oder wenig Ladungen tragen, wie
- 5 aprotische apolare Lösungsmittel, die durch eine niedrige Dielektrizitätskonstanten ( $\epsilon_r < 15$ ), niedrige Dipolmomente ( $\mu < 2,5 \text{ D}$ ) und niedrige  $\epsilon_r^N$ -Werte (0,0 - 0,5) charakterisiert sind. Aber auch dipolare organische Lösungsmittel oder deren Mischungen sind als Lösungsmittel für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet. Als
- 10 geeignete Lösungsmittel sind seien hier beispielhaft Methanol, Ethanol, Acetonitril, Ether, Heptan genannt. Auch schwache saure Lösungsmittel wie 0,01 - 0,1 % Ameisensäure, Essigsäure oder Trifluoressigsäure sind geeignet. Weiterhin sind auch schwach basische Lösungsmittel wie 0,01 - 0,1 % Triethylamin oder Ammoniak
- 15 geeignet. Auch stark saure oder stark basische Lösungsmittel wie 5%ige HCL oder 5%iges Triethylamin sind prinzipiell als Lösungsmittel geeignet. Auch Mischungen der vorgenannten Lösungsmittel sind vorteilhaft. Auch die in der Biochemie üblichen Puffer sind als Lösungsmittel geeignet, wobei vorteilhaft Puffer  $< 200 \text{ mM}$ ,
- 20 bevorzugt  $< 100 \text{ mM}$ , besonders bevorzugt  $< 50 \text{ mM}$ , ganz besonders bevorzugt  $< 20 \text{ mM}$  verwendet werden. Ebenfalls vorteilhaft ist es, wenn Puffer  $> 100 \text{ mM}$  für die Herstellung der Substanzgemische verwendet werden, dass die Puffer beispielsweise über eine Dialyse ganz oder teilweise entfernt werden. Als Puffer seien
- 25 beispielweise Acetat-, Formiat-, Phosphat-, Tris-, MOPS-, HEPES- oder deren Mischungen genannt. Hohe Puffer und/oder Salzkonzentrationen beeinflussen die Ionisationsprozesse negativ und sind gegebenenfalls zu vermeiden.
- 30 Im erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich Moleküle, die in den Substanzgemischen enthalten sind, von 100 Dalton (= D) bis 100 Kilodalton (= kD), bevorzugt von 100 D bis 20 kD, besonders bevorzugt von 100 D - 10 kD, ganz besonders bevorzugt von 100 D bis 2000 D nachweisen, das heißt identifizieren und gegebenenfalls auch quantifizieren.

Vorteilhaft können die Substanzgemische für das erfindungsgemäße Verfahren, die sonst nur schlecht oder gar nicht nachweisbar sind vor der Analyse derivatisiert werden und so schließlich analy-  
40 siert werden. Eine Derivatisierung ist besonders vorteilhaft in Fällen, in denen in hydrophobe bzw. flüchtige Verbindungen beispielsweise wie Ester, Amide, Lactone, Aldehyde, Ketone, Alkohole etc. hydrophile Gruppen eingeführt werden, die vorteilhaft noch eine ionisierbare Funktionalität tragen. Beispiele für derartige  
45 Derivatisierungen sind Umsetzungen von Aldehyden oder Ketonen zu Oximen, Hydrazonen oder deren Derivate oder Alkoholen zu Estern beispielsweise mit symmetrischen oder gemischten Anydriden. Da-

durch kann das Nachweisspektrum des Verfahrens vorteilhaft erweitert werden.

Vorteilhaft wird im erfindungsgemäßen Verfahren zur Analyse der  
5 Substanzgemische ein interner Standard wie z.B. Peptide, Amino-  
säuren, Coenzyme, Zucker, Alkohole, konjugierte Alkene, organi-  
sche Säuren oder Basen zugesetzt. Dieser interne Standard ermög-  
licht vorteilhaft die Quantifizierung der Verbindungen im Ge-  
misch. Im Substanzgemisch enthaltende Substanzen können so leich-  
10 ter analysiert und letztlich quantifiziert werden.

Als internen Standard werden vorteilhaft markierte Substanzen verwendet, prinzipiell sind aber auch nicht markierte Substanzen als interner Standard geeignet. Derartige ähnliche chemische Ver-  
15 bindungen sind beispielsweise sogenannte Verbindungen einer homologen Reihe, deren Mitglieder sich nur durch beispielsweise eine zusätzliche Methylengruppe unterscheiden. Als interner Standard werden bevorzugt durch mindestens ein Isotop ausgewählt aus der Gruppe  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{36}\text{S}$ ,  $^{35}\text{Cl}$ ,  $^{37}\text{Cl}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  
20  $^{30}\text{Si}$ ,  $^{74}\text{Se}$  oder deren Mischungen markierte Substanzen verwendet. Bevorzugt wird aus Kostengründen und aus Gründen der Zugänglichkeit  $^2\text{H}$  oder  $^{13}\text{C}$  als Isotop verwendet. Diese internen Standard brauchen für die Analyse nicht komplett, das heißt vollmarkiert zu sein. Eine Teilmarkierung ist völlig ausreichend. Vorteilhaft  
25 wird auch im Falle eines markierten internen Standards eine Substanz gewählt, die eine möglichst hohe Homologie zu den im Ge-  
misch zu analysierenden Substanzen, das heißt strukturelle Ähn-  
lichkeit, zu der zu messenden chemischen Verbindung hat. Je höher die strukturelle Ähnlichkeit ist, desto besser sind die Messer-  
30 gebnisse und desto genauer kann eine Quantifizierung der Verbin-  
dung erfolgen.

Für das erfindungsgemäße Verfahren und besonders für die Quantifi-  
fizierung der im Gemisch vorhandenen Substanzen ist es vorteil-  
35 haft den internen Standard in einem günstigen Verhältnis zu der zu messenden Substanz einzusetzen. Verhältnisse von Analyt (= zu bestimmende Verbindung) zu internem Standard größer 1:15 führen zu keiner Verbesserung der Messergebnisse, sind jedoch prinzipiell möglich. Vorteilhaft wird ein Verhältnis von Analyt zu  
40 internem Standard in einem Bereich von 10:1 bis 6:1 eingestellt, bevorzugt in einem Bereich von 6:1 bis 4:1, besonders bevorzugt in einem Bereich von 2:1 bis 1:1.

Die Substanzgemischproben im erfindungsgemäßen Verfahren können  
45 manuell oder vorteilhaft automatisch mit üblichen Laborrobotern vorbereitet werden. Auch die Analyse mit dem Massenspektrometer nach gegebenenfalls chromatographischer Auftrennung kann manuell

## 15

oder vorteilhaft automatisch durchgeführt werden. Durch die Automatisierung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die Massenspektrometrie vorteilhaft zum schnellen Screening von verschiedenen Substanzgemischen beispielsweise Pflanzenextrakten im sogenannten 5 High-Throughput-Screening verwendet werden. Dabei zeichnet sich das erfindungsgemäße Verfahren durch eine hohe Empfindlichkeit, eine gute Quantifizierbarkeit, einer hervorragenden Reproduzierbarkeit, bei geringstem Probenverbrauch aus. Mit der Methode können also rasch Gemische biologischen Ursprungs beispielsweise neue 10 Mutanten bekannter oder unbekannter enzymatischer Aktivitäten nach einer Mutagenese beispielsweise nach einer klassischen Mutagenese mit chemischen Agentien wie NTG, Strahlung wie UV-Strahlung oder Röntgenstrahlung oder nach einer sogenannten site-directed mutagenesis, PCR-Mutagenese, Transposon-Mutagenese oder 15 dem sogenannten gene shuffling gefunden werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Analyse einer breiten Palette von Substanzen in einem weiten Messbereich, bei guter bis sehr guter Auflösung, bei einer hohen Ionentransmission von 20 der Quelle zum Detektor, einer hohen Scan-Geschwindigkeit sowohl im Full Scan-Modus aller Substanzen in den Substanzgemischen als auch im multiple reaction monitoring-Modus [= MRM, Verfahrensschritte (a) bis (c)]. Weiterhin hat das Verfahren eine sehr hohe Aufnahmeeempfindlichkeit und eine hervorragende Kallibrierungs- 25 Stabilität. Weiterhin ist es für den Dauerbetrieb und damit für die Anwendung in einem HTS-Screening ausgezeichnet geeignet.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

30 Beispiele

1. Beispiele MRM + FS-Messungen

a) TIC der MRM + FS-Messung

35 In Figur 2 ist das Total Ion Chromatogram einer MRM + Full Scan-Messung [MRM = Multiple Reaction Monitoring, FS = Full Scan, TIC = Total Ion Chromatogram, XIT = Summe mehrerer Total Ion Chromatogramme] dargestellt. Gemessen wurde ein Qualitätskontrollprobe. 40 Diese Art von Probe enthält eine definierte Anzahl an Analyten. Diese Analyten wurden käuflich erworben und in bekannten Konzentrationen in geeignetem Lösungsmittel gelöst.

Die in Figur 2 gewählte Darstellung der Messung zeigt die Aufsummierung der am Detektor zu den jeweiligen Zeitpunkten (x-Achse) 45 gemessenen Intensitäten (y-Achse) aus den beiden massenspektrometrischen Experimenten des Multiple Reaction Monitoring (MRM)

**16**

und des Full Scan (FS). Das Chromatogramm in Figur 2 stellt also die Summe der TIC-Chromatogramme der beiden o.g. genannten massenspektrometrischen Experimenten dar.

**5 b) TIC des MRM-Experiment und TIC des FS-Experiment**

In Figur 3 ist das Total Ion Chromatogramm des MRM-Experiments aus einer MRM + FS-Messung dargestellt.

**10** Die in Figur 3 gewählte Darstellung der MRM-Messung zeigt die Aufsummierung der am Detektor zu den jeweiligen Zeitpunkten (x-Achse) gemessenen Intensitäten (y-Achse) aus allen vordefinierten Massenübergängen des MRM-Experiments. Die in Figur 4 gewählte Darstellung zeigt die jeweiligen Messergebnisse jedes **15** einzelnen Massenübergangs (hier 30 Stück) in einem Koordinatenkreuz.

**c) TIC des FS-Experiment**

**20** Das im Wechsel zum MRM-Experiment gemessene FS-Experiment ist im TIC in Figur 5 dargestellt.

In Figur 6 ist der TIC des FS-Experiments dargestellt. Die Aufsummierung aller FS-Massenspektren, die in dem schraffiert dargestellten Zeitfenster aufgenommen wurden sind in Figur 7 dargestellt.

**d) TIC eines MRM-Experiments**

**30** In Figur 8 ist wie in Figur 2 ein Total Ion Chromatogramm einer MRM + Full Scan-Messung dargestellt. Gemessen wurde eine Kalibrierungsprobe.

Die in Figur 8 gewählte Darstellung der Messung zeigt die **35** Aufsummierung der am Detektor zu den jeweiligen Zeitpunkten (x-Achse) gemessenen Intensitäten (y-Achse) aus dem massenspektrometrischen Experiment des Multiple Reaction Monitoring.

Figur 9 gibt ein extrahiertes Chromatogramm wieder, in dem Coenzym **40** Q 10 identifiziert wurde.

Figur 10 und Figur 11 geben die Identifizierung von jeweils Capsanthin und Bixin wieder.

**45** Figur 12 gibt ein Total Ion Chromatogramm eines Full Scan eines Pflanzenextraktes wieder.

17

Die Figuren 13 bis 15 zeigen die Massen verschiedener Analyten im extrahierten Chromatogramm, deren Zuordnung zu einer spezifische Struktur noch erfolgen muss.

- 5 In dem beschriebenen Verfahren ließen sich bisher 200 weitere Analyten selektiv nachweisen.

10

15

20

25

30

35

40

45

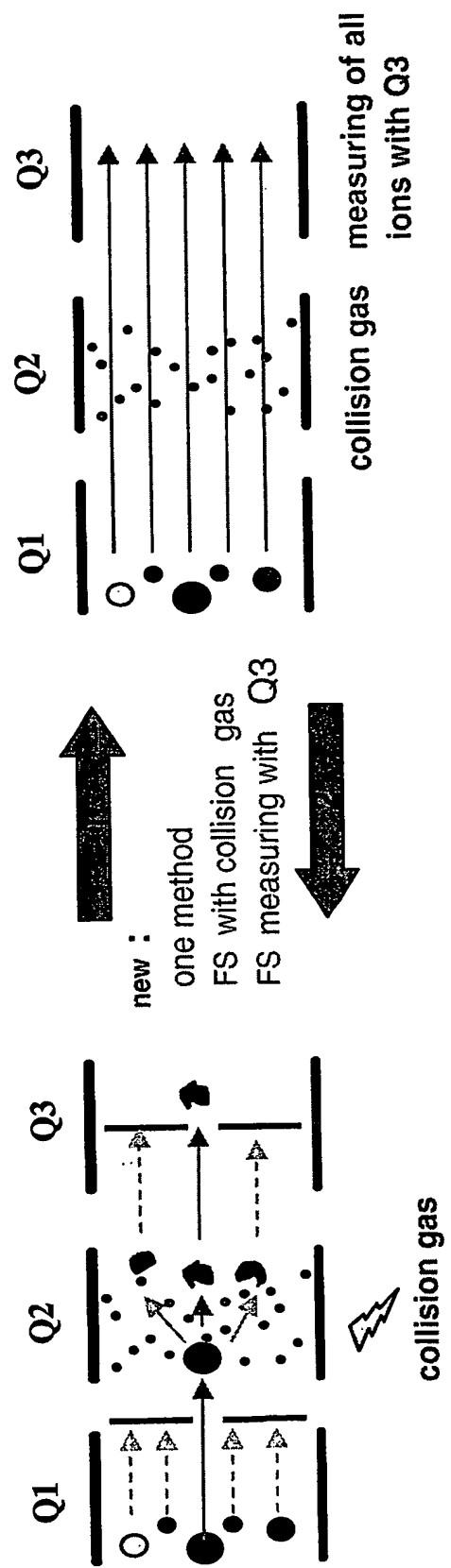
## Patentansprüche

1. Massenspektrometrisches Verfahren zur Analyse von Substanz-  
5 gemischen mit einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer,  
wobei die Substanzgemische vor der Analyse ionisiert werden,  
dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren folgende Schritte  
umfaßt:
  - 10 a) Auswählen eines Masse/Ladungs-Quotienten ( $m/z$ ) eines  
durch Ionisation entstandenen Ions in einem ersten  
analytischen Quadrupol (I) des Massenspektrometers,
  - 15 b) Fragmentieren des unter (a) ausgewählten Ions unter  
Anlegung einer Beschleunigungsspannung in einem weiteren  
folgenden Quadrupol (II), das mit einem Kollisionsgas  
gefüllt ist und als Kollisionskammer fungiert,
  - 20 c) Auswählen eines Masse/Ladungs-Quotient eines durch die  
Fragmentierung (b) entstandenen Ions in einem weiteren  
nachfolgenden Quadrupol (III), wobei die Verfahrens-  
schritte (a) bis (c) mindestens einmal durchlaufen werden  
und
  - 25 d) Analysieren der Masse/Ladungs-Quotienten aller im  
Substanzgemisch durch die Ionisation vorhandenen Ionen,  
wobei das Quadrupol (II) mit Kollisionsgas gefüllt ist,  
jedoch während der Analyse keine Beschleunigungsspannung  
angelegt ist;  
30 wobei die Schritt (a) bis (c) und der Schritt (d) auch in  
umgekehrter Reihenfolge durchgeführt werden können.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der  
35 Ionisation des Substanzgemisches eine chromatographische  
Auftrennung vorgeschaltet ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,  
dass es sich bei der chromatographischen Auftrennung um eine  
40 HPLC-Auftrennung handelt.

4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte (a) bis (d) innerhalb von 0,1 bis 10 Sekunden mindestens einmal durchlaufen werden.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte (a) bis (d) innerhalb von 0,2 bis 2 Sekunden mindestens einmal durchlaufen werden.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet,  
10 ionisation durch Verdampfung des Substanzgemisches und Ionisation in der Gasphase, durch Desorption des Substanzgemisches an einer Oberfläche oder durch Zerstäubung des Substanzgemisches im elektrischen Feld erfolgt.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Ionisation durch Zerstäubung des Substanzgemisches im elektrischen Feld erfolgt.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet,  
20 dass in Schritt (a) zwischen 1 und 100 Masse/Ladungs-Quotienten verschiedener durch Ionisation entstandener und ausgewählter Ionen analysiert wird.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet,  
25 dass das Substanzgemisch biologischen oder chemischen Ursprungs ist.
10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet,  
30 dass die Substanzgemische vor der Analyse oder vor der chromatographischen Auftrennung nach Anspruch 2 oder 3 derivatisiert werden.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet,  
35 dass das Verfahren manuell oder automatisch durchgeführt wird.
12. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren in einem High Throughput Screening verwendet wird.
- 40 13. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das in Schritt (c) analysierte Fragmention und die in Schritt (d) analysierten (m/z)-Quotienten aller im Substanzgemisch vorhandenen Ionen oder das in Schritt (c) analysierte Fragmention oder die in Schritt (d) analysierten (m/z)-Quotienten aller im Substanzgemisch vorhandenen Ionen quantifiziert werden.

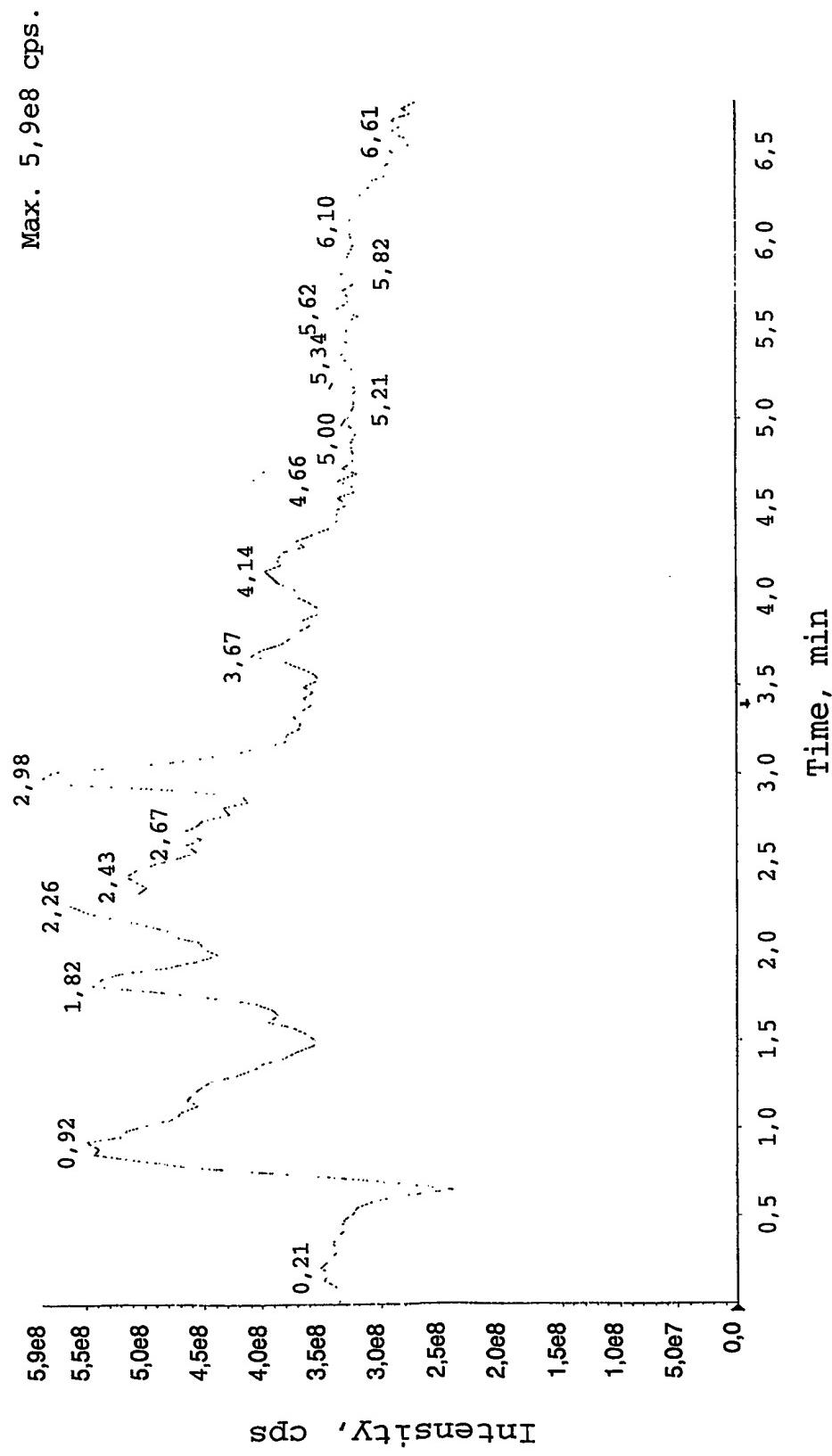
1/15

Figur 1: Schematische Darstellung des Analyseverfahrens



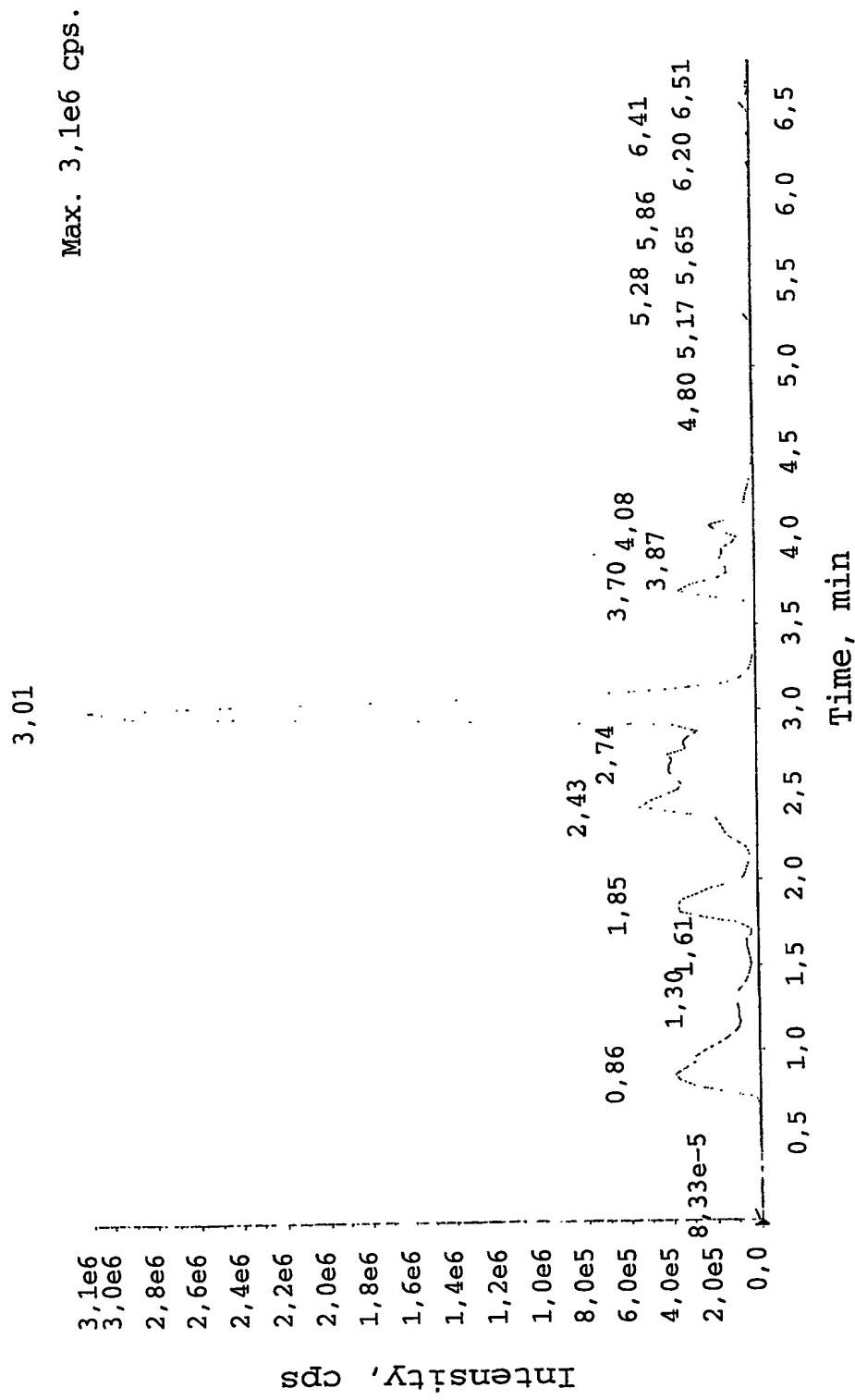
2/15

Figure 2: Total Ion Chromatogram (TIC) einer MRM + Full Scan-Messung  
TIC: from Sample 2 (QC 1) of LCMS04\_020207\_OF1.wiff



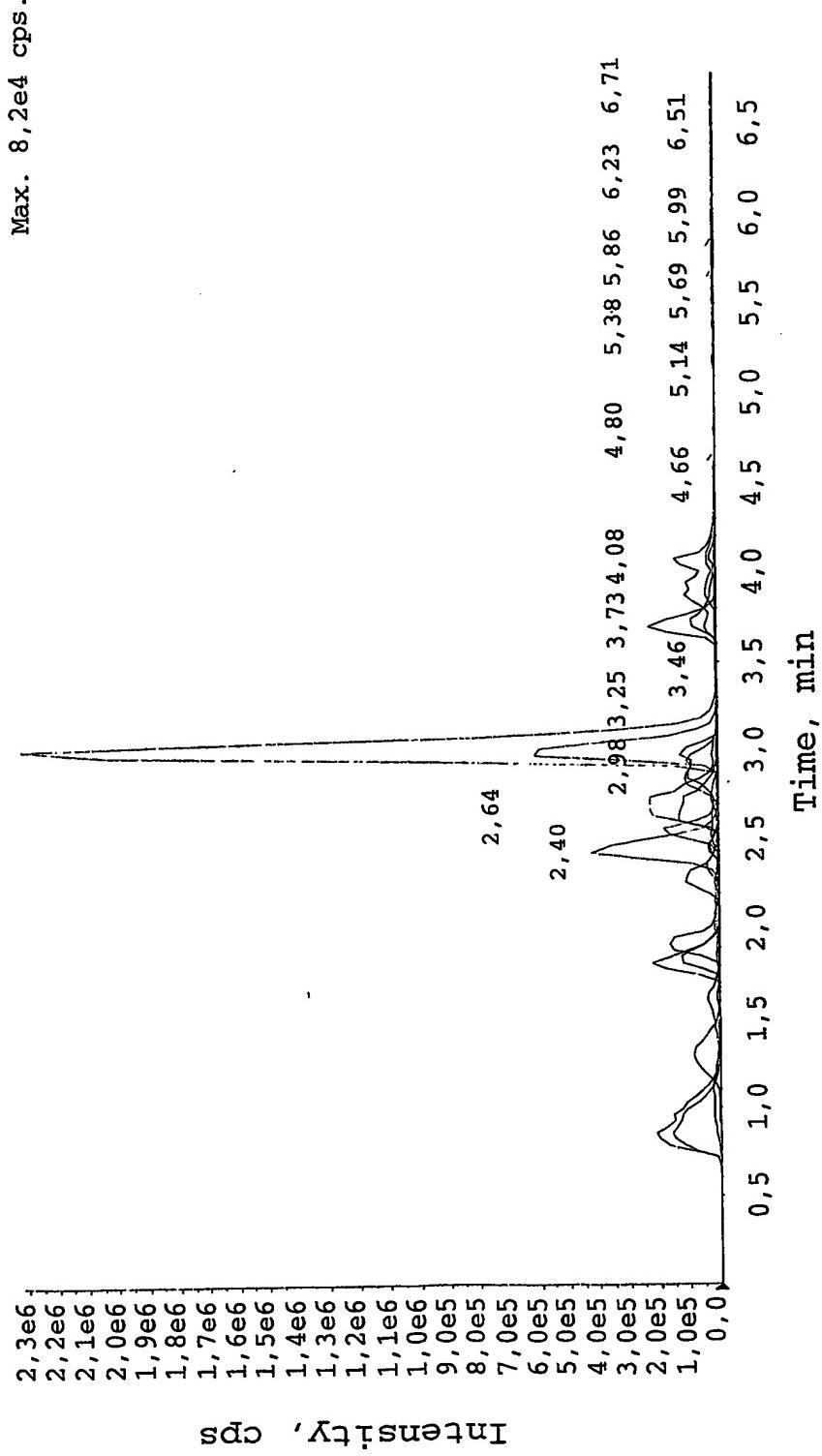
3/15

Figur 3: Total Ion Chromatogram (TIC) des MRM-Experiments aus einer MRM + FS-Messung  
 TIC off +MRM (30 pairs): Experiment 1, from Sample 2 (QC1) of LCMS04\_020207\_0F1.wiff



4/15

Figur 4: Total Ion Chromatogram (TIC) des MRM-Experiments aus einer MRM + FS-Messung  
XIC of +MRM (30 pairs): Experiment 1,536,4/69,0 amu from Sample 2 (QC1) of LCMS04\_020207\_0F1.wiff



5/15

Figure 5:  
TIC des FS-Experiments (TIC of +03: Experiment 2 from Sample 2 (QC1) of  
LCMS04\_020207\_0F1.wiff)

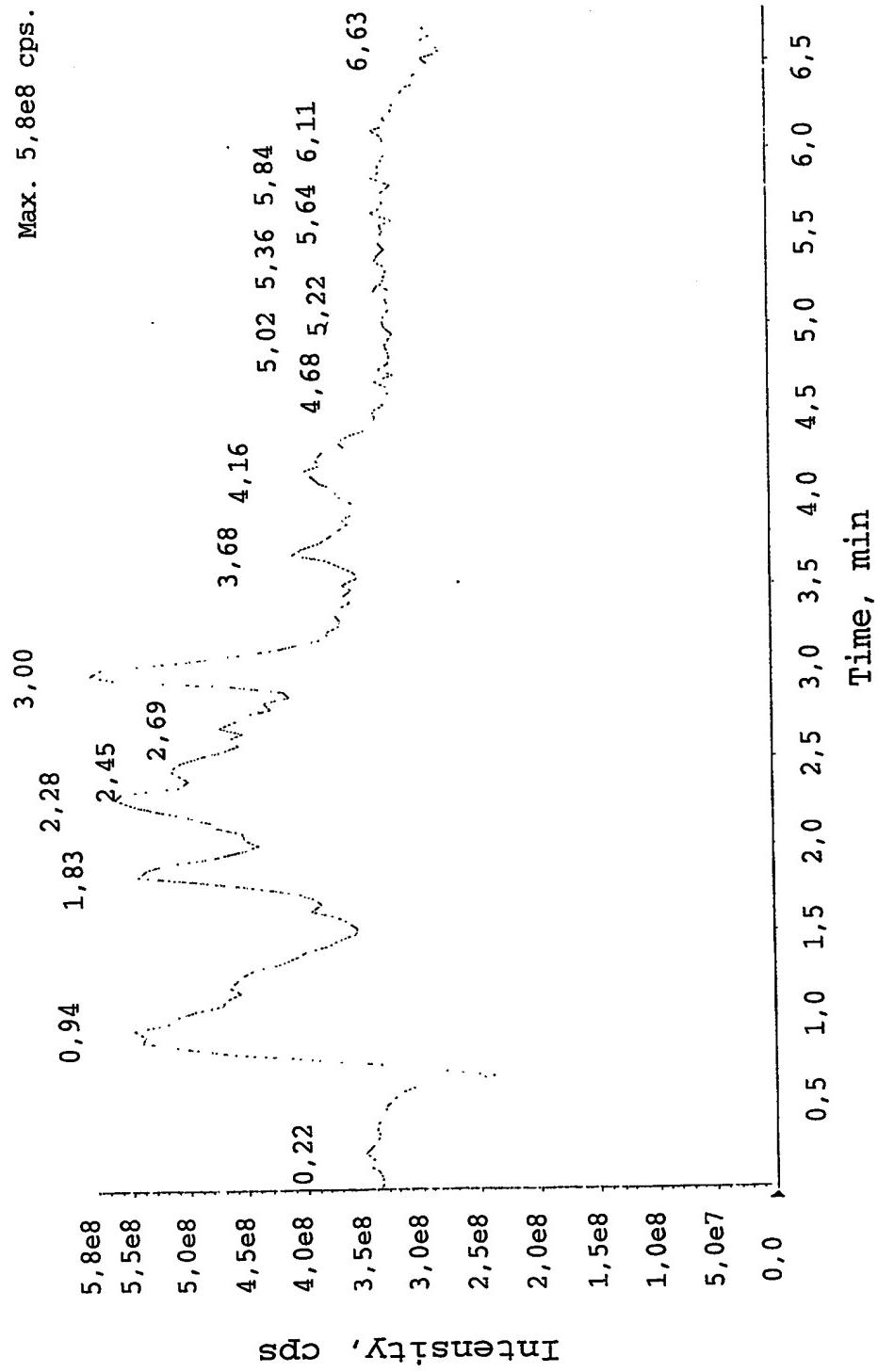
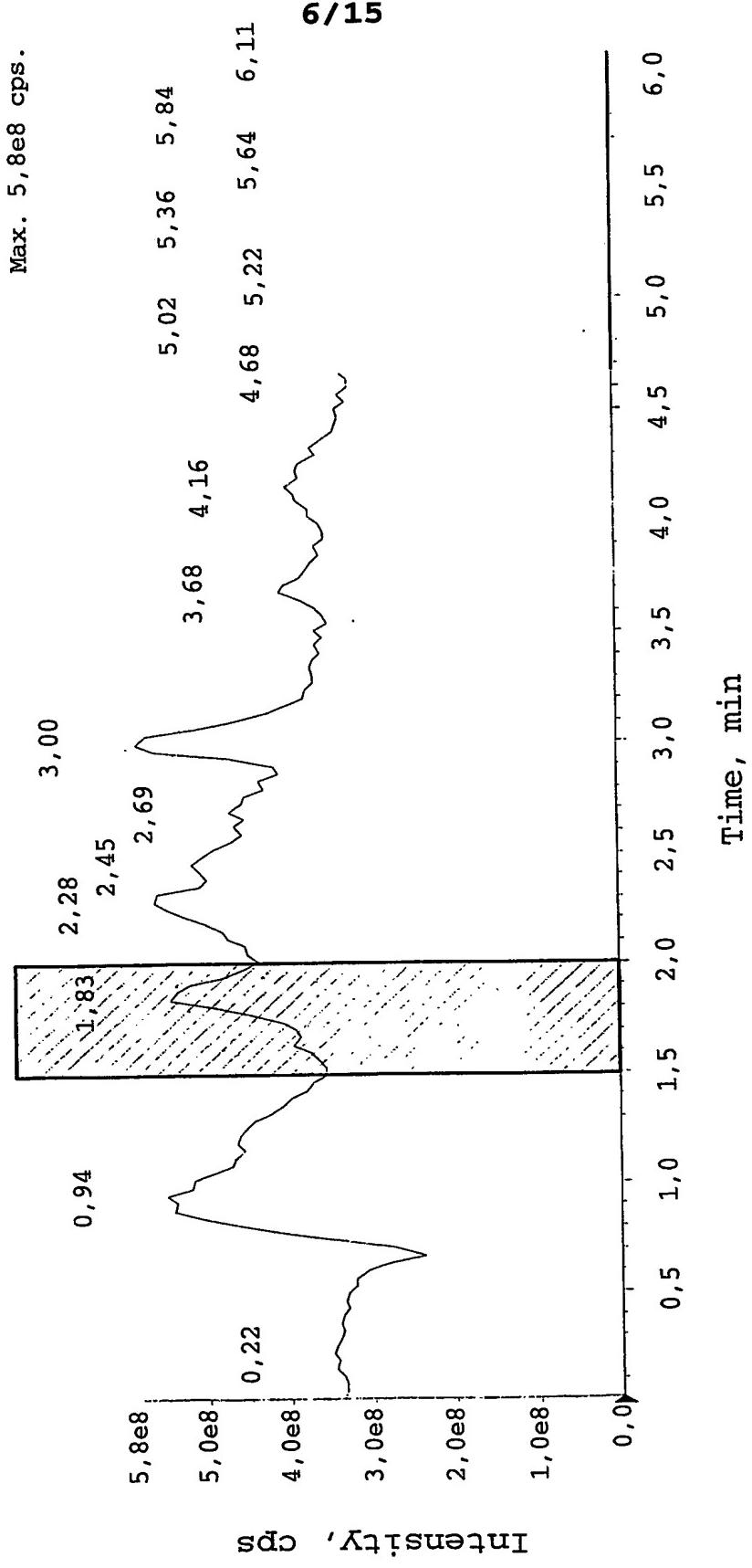
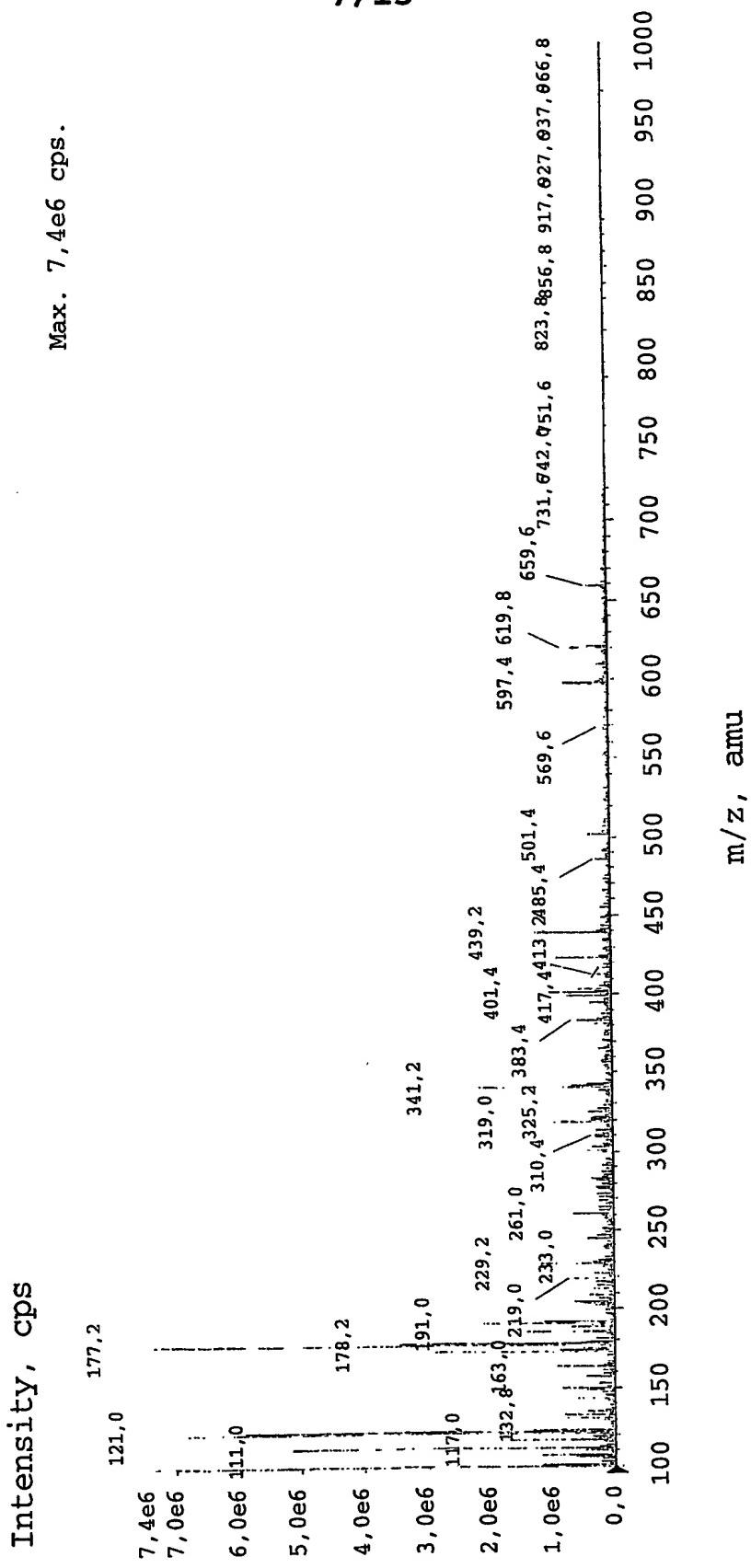


Figure 6:  
TIC des FS-Experiments (TIC of +Q3: Experiment 2 from Sample 2 (QC1) of  
LCMS04\_020207\_0F1.wiff)



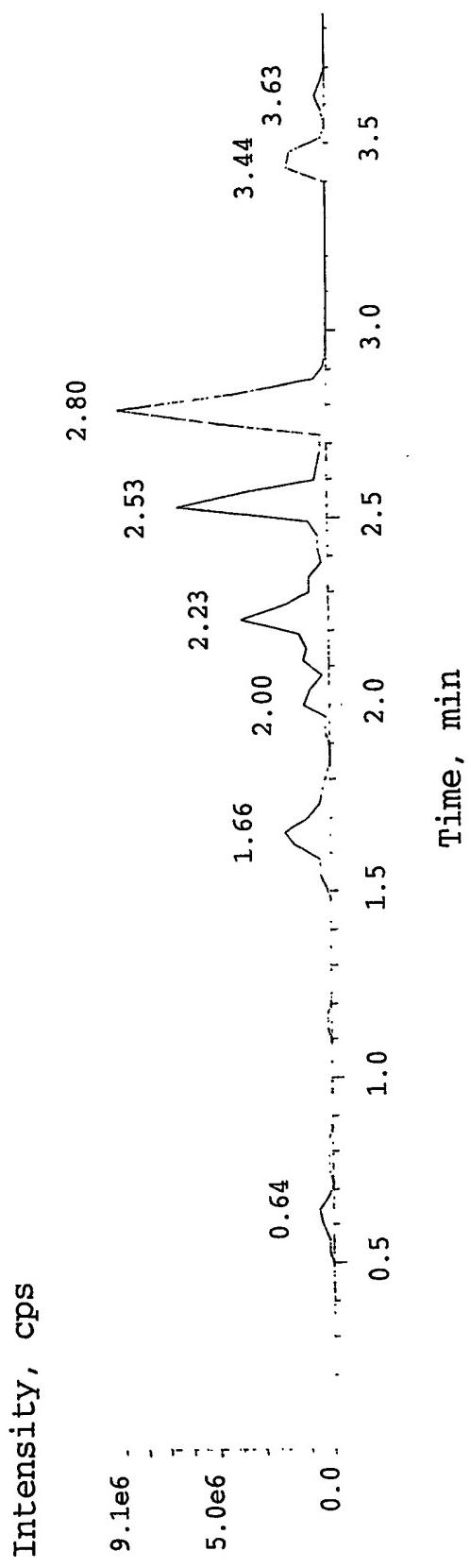
7/15

Figure 7:  
TIC des FS-Experiments (+Q3: Experiment 2; 1,491 to 2,004 min from Sample 2  
(QC1) of LCMS04\_020207\_0F1.wiff)



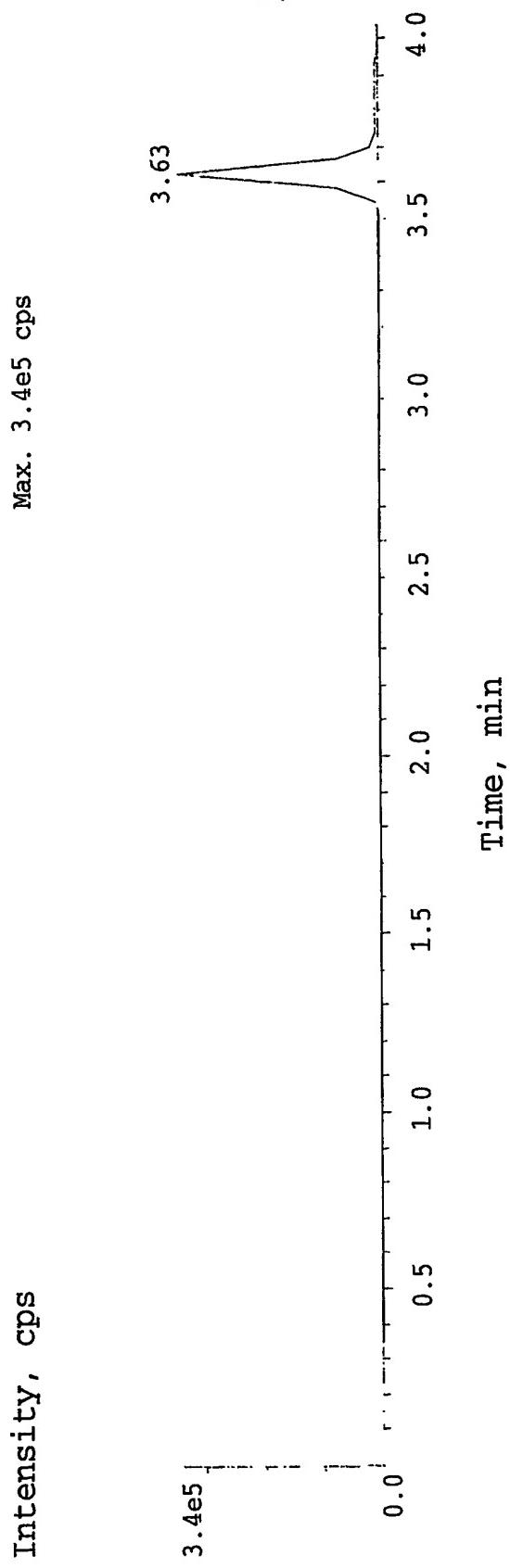
8/15

Figure 8: Total Ion Chromatogram (TIC) of MRM-Experiment TIC of MRM (36 pairs): Experiment 1 from Sample 2 (Kalibmix-lip-14.08.2002-14) of LCMS02\_020814\_0F3.wiff



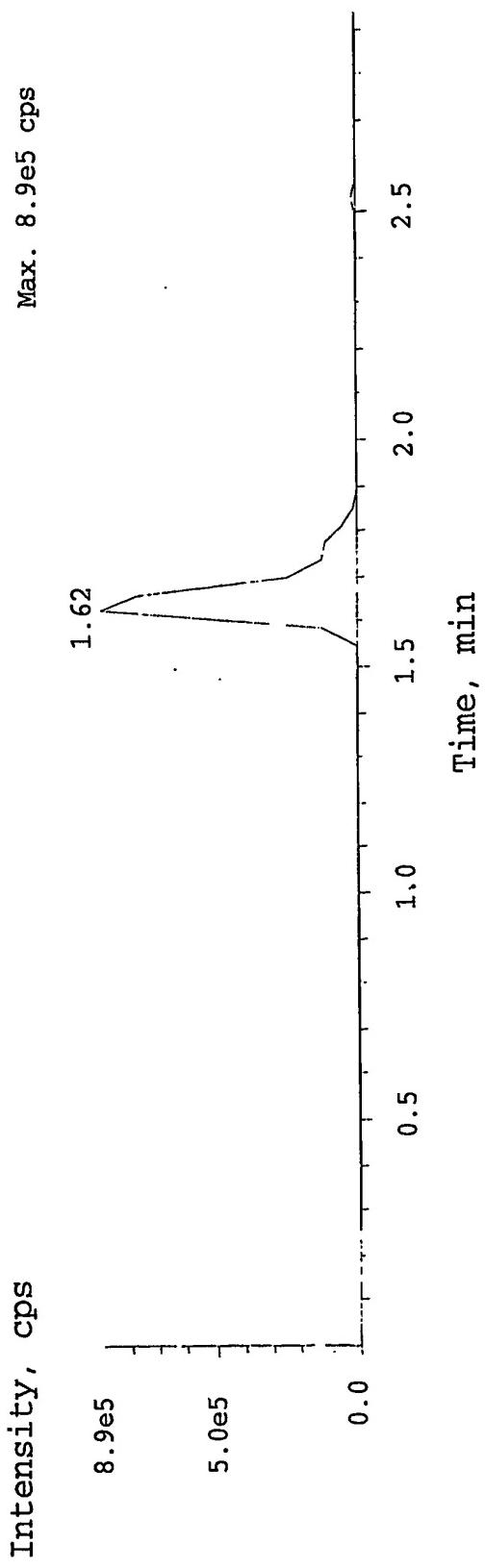
9/15

Figure 9: Extracted Chromatogram from Transition m/z 863.7 to 197 (Coenzym Q10) TIC of MRM (36 pairs): Experiment 1; 863.7/197, 0 amu from Sample 2 (Kalibmix-lip-14.08.2002-14) of LCMS02\_020814\_OF3.wiff)



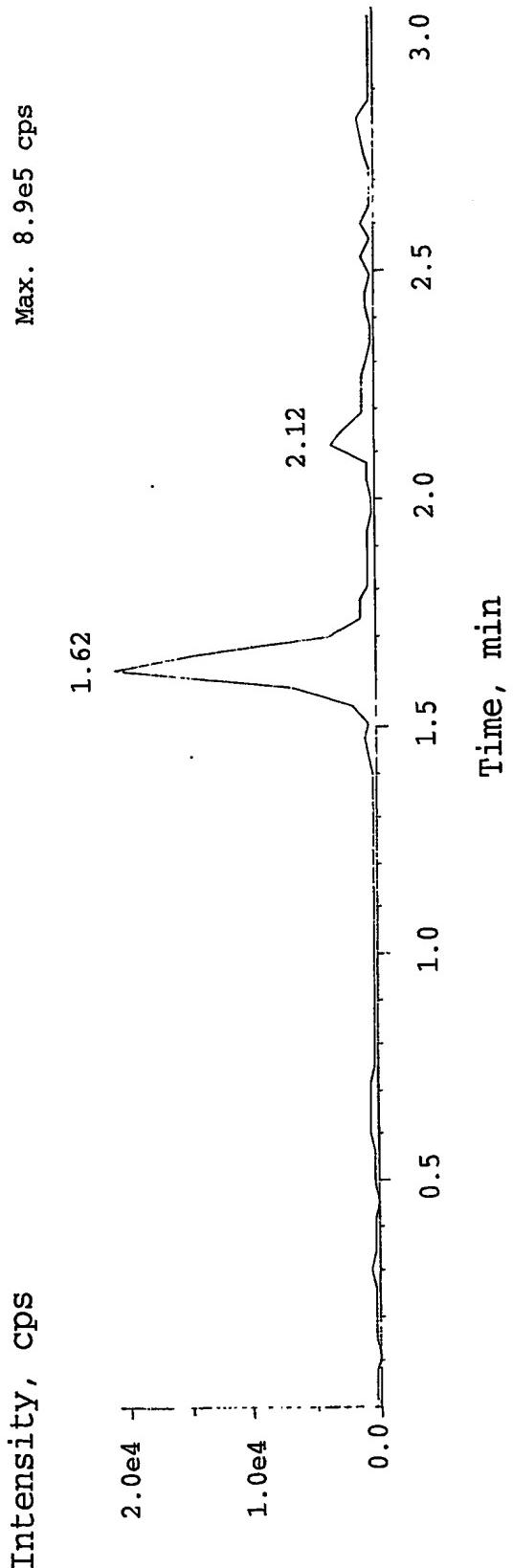
10/15

Figure 10: Extracted Chromatogram from Transition m/z 585.4 to 109.1 (Capsanthin)  
TIC of MRM (36 pairs): Experiment 1; 585.4/109.1 amu from Sample 2  
(Kalibmix-lip-14.08.2002-14) of LCMS02\_020814\_0F3.wiff



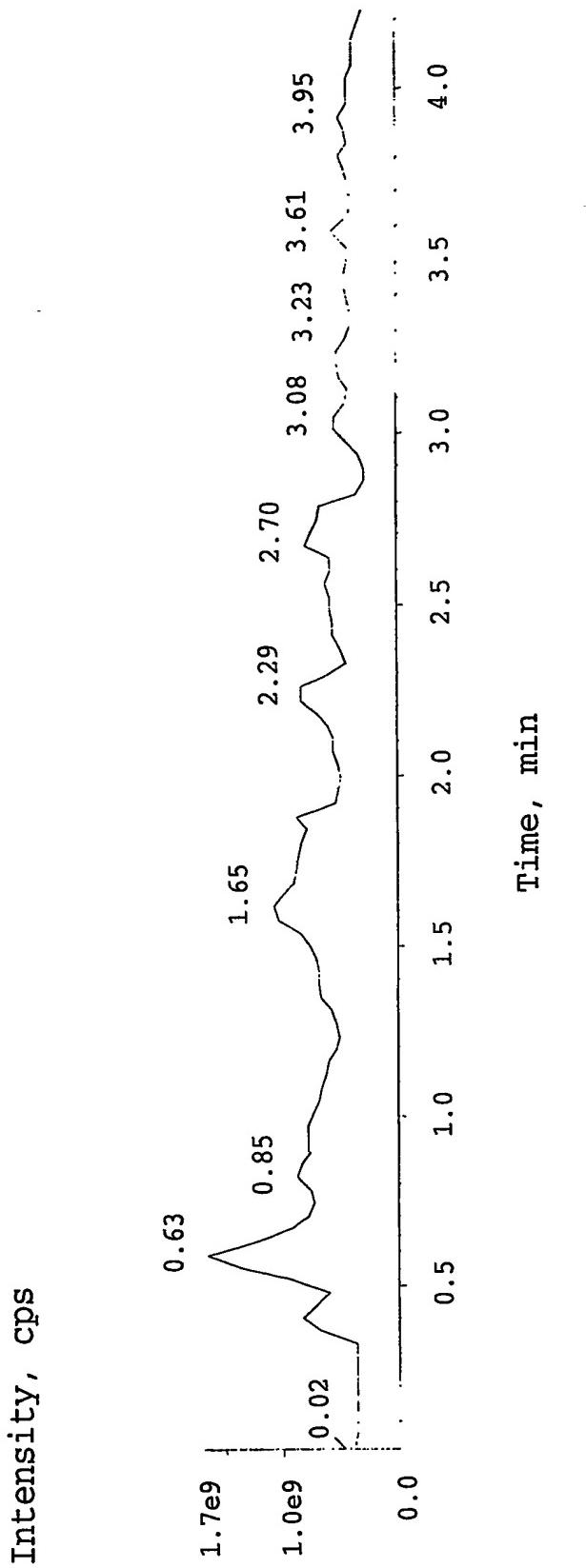
11/15

Figure 11: Extracted Chromatogram from Transition m/z 395.1 to 91.1 (Bixin)  
TIC of NMR (36 pairs): Experiment 1; 395.1/91.1 amu from Sample 2  
(Kalibmix-lip-14.08.2002-14) of LCMS02\_020814\_0F3.wiff



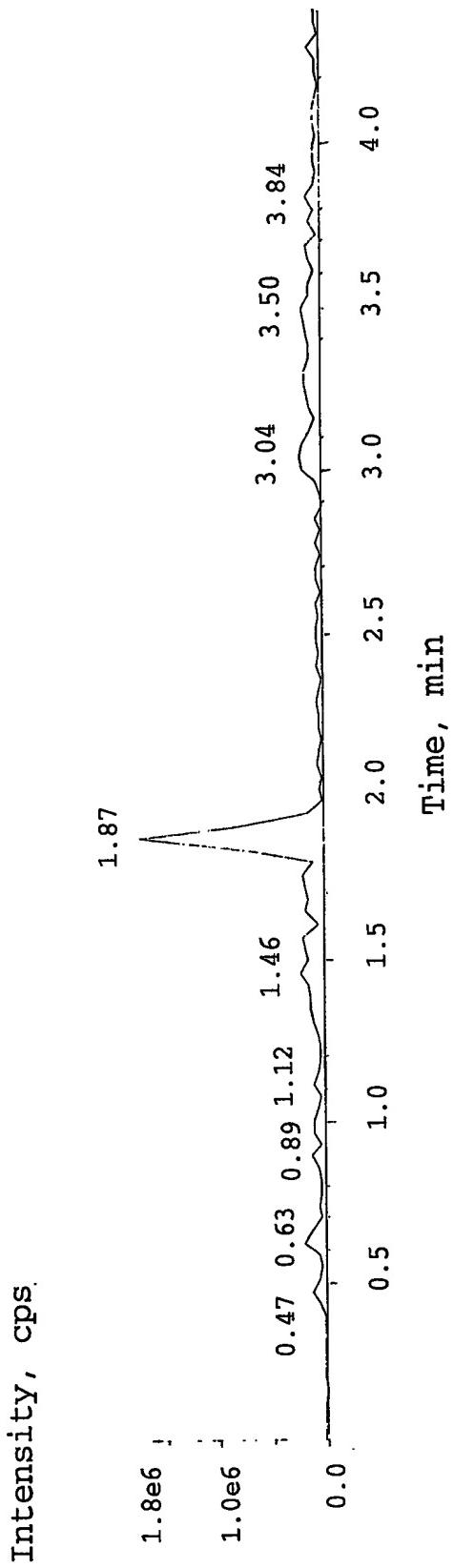
12/15

Figure 12: Total Ion Chromatogram (TIC) of FS-Experiment TIC of +Q3: Experiment 2 from Sample 4 [LC-L1HA-1ip-12.08.2002-(84)-676735 of LCMS02\_020814\_0F3.wiff]



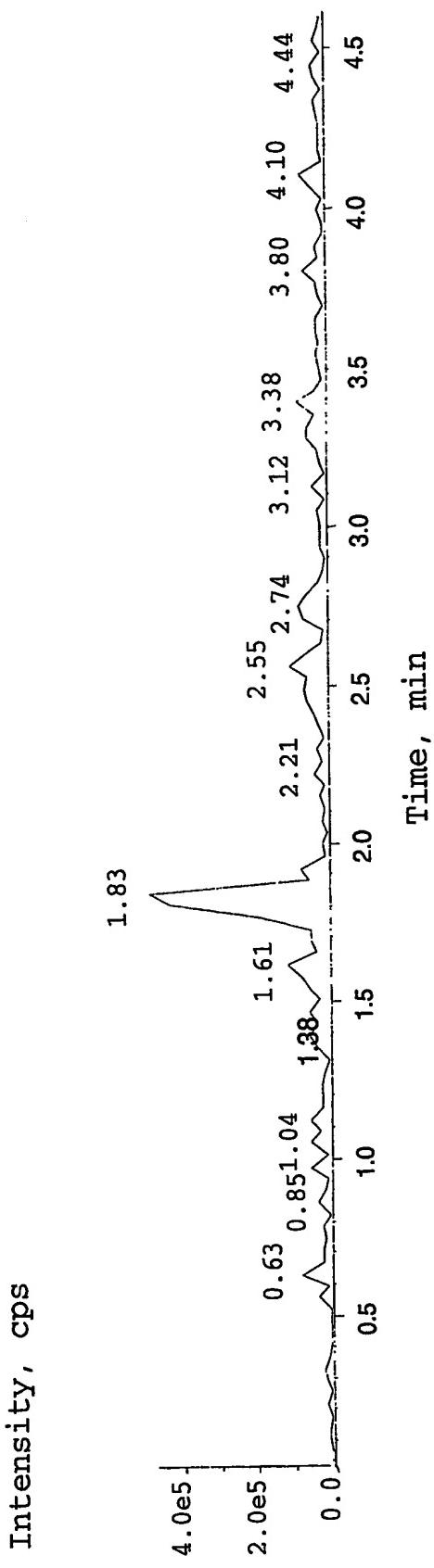
13 / 15

Figure 13: Extracted Chromatogram from Signal m/z 518.4 (metanomics-Analyte 600000038)  
XIC of +Q3: Experiment 2; 518.4 amu from Sample 4  
[LC-L1HA-1ip-12.08.2002-(84)-676735 of LCMS02\_020814\_OF3.wiff]

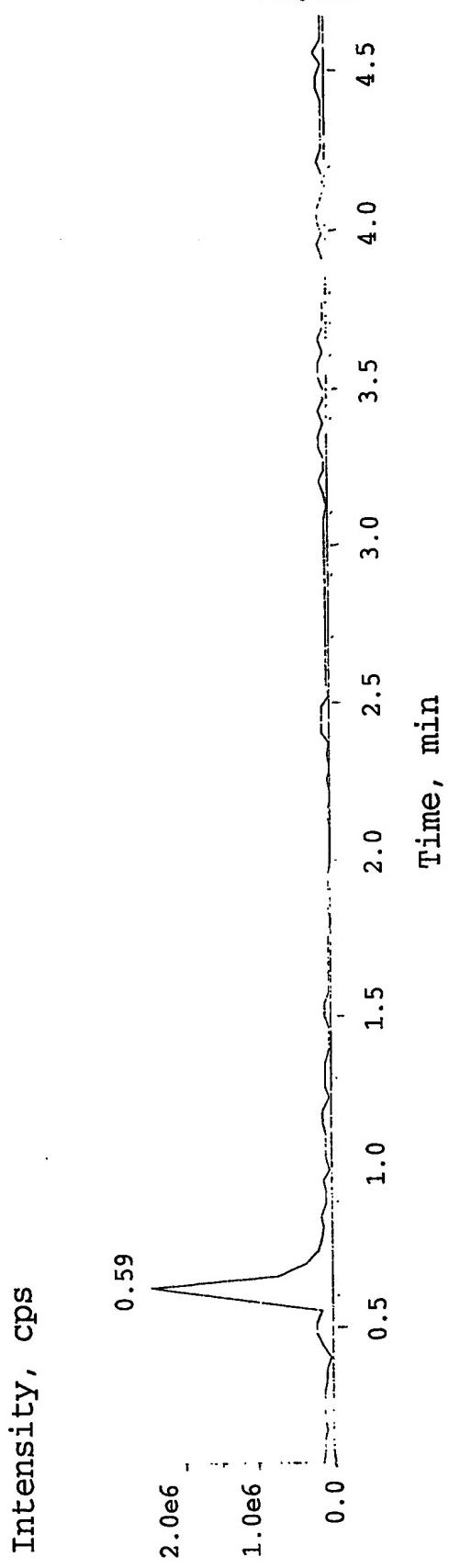


**14/15**

Figure 14: Extracted Chromatogram from Signal m/z 609.2 (metanomics-Analyte 600000049)  
XIC of +Q3: Experiment 2; 609.2 amu from Sample 4  
[LC-L1HA-lip-12.08.2002-(84)-676735 of LCMS02\_020814\_OF3.wiff]



15/15



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01274

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 H01J49/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 H01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, INSPEC

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 140 638 A (TANNER SCOTT D ET AL) 31 October 2000 (2000-10-31) column 10; claims 1-5 -----	1,9-11
Y	ESMANS E L ET AL: "Liquid chromatography-mass spectrometry in nucleoside, nucleotide and modified nucleotide characterization" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, vol. 794, no. 1-2, 23 January 1998 (1998-01-23), pages 109-127, XP004115390 ISSN: 0021-9673 column 117, paragraph 2 -----	2-7
Y		2-7

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## ° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

Date of mailing of the International search report

3 June 2003

16/06/2003

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hulne, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 01274

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 6140638	A 31-10-2000	AU 7753298 A	WO 9856030 A1	21-12-1998

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 01274

**A. Klassifizierung des Anmeldungsgegenstandes**  
IPK 7 H01J49/42

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  
IPK 7 H01J

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, INSPEC

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 6 140 638 A (TANNER SCOTT D ET AL) 31. Oktober 2000 (2000-10-31)	1, 9-11
Y	Spalte 10; Ansprüche 1-5 ---	2-7
Y	ESMANS E L ET AL: "Liquid chromatography-mass spectrometry in nucleoside, nucleotide and modified nucleotide characterization" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, Bd. 794, Nr. 1-2, 23. Januar 1998 (1998-01-23), Seiten 109-127, XP004115390 ISSN: 0021-9673 Spalte 117, Absatz 2 -----	2-7

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Aussetzung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
3. Juni 2003	16/06/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hulne, S

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Aktenzeichen

PCT/EP 01274

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6140638	A 31-10-2000	AU 7753298 A	21-12-1998
		WO 9856030 A1	10-12-1998
		EP 0986823 A1	22-03-2000
		JP 2002526027 T	13-08-2002